

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-276999  
 (43)Date of publication of application : 26.10.1993

(51)Int.Cl. C12Q 1/68  
 C07H 21/04  
 C12N 15/10  
 C12Q 1/04  
 //C12Q 1/04  
 C12R 1:01 )

(21)Application number : 04-080769	(71)Applicant : TOYOBO CO LTD
(22)Date of filing : 02.04.1992	(72)Inventor : MATSUOKA AKIRA KAGAWA SHOHEI OTSUKA NORIMITSU YAMASHITA KEIKO KUMAGAI SHIYOUKO SATOU MIYUKI

**(54) OLIGONUCLEOTIDE FOR DETECTING BACTERIUM BELONGING TO GENUS CAMPYLOBACTER, METHOD FOR DETECTING BACTERIUM BELONGING TO GENUS CAMPYLOBACTER AND REAGENT KIT FOR DETECTION**

**(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain a new oligonucleotide useful for rapidly and simply carrying out the detection of a bacterium belonging to the genus Campylobacter and/or the identification of the bacterial species belonging to the genus Campylobacter.

CONSTITUTION: The objective oligonucleotide has a nucleic acid sequence expressed by formulas I to XIV or a sequence complementary thereto. This oligonucleotide specific for a pathogenic bacterium belonging to the genus Campylobacter, especially *Campylobacter jejuni* or *Campylobacter coli* is expressed by formulas I to XII preferably formulas VII to X and XII. Various oligonucleotides are synthesized according to a phosphoramidite method by using a DNA synthesizer model 391 manufactured by Applied Biosystems, Inc. (ABI) and then purified by a reversed phase column of fast protein liquid chromatography(FPLC) manufactured by Pharmacia AB.

DOCUMENT STATUS	I	ATTACHED DRAWINGS	2
EXAMINER'S INSTRUCTION	II	EXAMINER APPROVAL	DA
COMPOSITION CLAIMS	III	CLAIMANT INFORMATION	X
EXAMINER'S DOCUMENT	IV	EXAMINER REVIEW	X j
DOCUMENT ATTACHED	V	EXAMINER APPROVAL	X II
EXAMINER'S INSTRUCTION	VI	EXAMINER APPROVAL	X III
EXAMINER'S ATTACHED	VII	EXAMINER APPROVAL	X IV

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

[Claim 1] An array table and the array numbers 1–14 (however, in an adenine and C, a cytosine and G express a guanine and, as for A, T expresses a thymine.) Moreover, T of the location of arbitration may be permuted by the uracil (U). Oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection which has the shown nucleic-acid array or has those complementary sequences.

[Claim 2] The indicator oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection which labeled the oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection according to claim 1.

[Claim 3] The method of detecting the Campylobacter bacteria in the sample characterized by measuring the indicator of the combination which labeled the oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection according to claim 1, was made to cross the obtained indicator nucleic acid probe with DNA or RNA in a sample, and crossed it.

[Claim 4] or [ making the oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection of claim 1 into a nucleic-acid primer as it is ] -- or the method of detecting the Campylobacter bacteria in the sample which make cross the indicator nucleic-acid primer labeled and obtained with DNA or RNA in a sample, it is made to carry out primer expanding, and is characterized by measuring the obtained primer expanding object.

[Claim 5] The reagent kit for detection of the Campylobacter bacteria in the sample characterized by including the indicator nucleic acid probe obtained by carrying out the indicator of the oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection of claim 1.

[Claim 6] or [ that the oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection of claim 1 is included as a nucleic-acid primer as it is ] -- or magnification of the Campylobacter bacteria characterized by including the indicator nucleic-acid primer labeled and obtained and the reagent kit for detection.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]****[0001]**

**[Industrial Application]** This invention relates to detecting the Campylobacter (Campylobacter) group bacteria simple and quickly. Furthermore, it is related with detecting the bacteria which turn into pathogenic bacteria of enteric infection in the bacteria belonging to Campylobacter in detail.

**[0002]**

**[Description of the Prior Art]** The Campylobacter bacteria are disease germs of livestock, such as a dog, a goat, a fowl, and a cow, and are known for starting a miscarriage, diarrhea, etc. As pathogenic bacteria of human diarrhea, *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Campylobacter coli* (*C. coli*), etc. are mainly known. These bacteria are accepted as a food poisoning cause bacillus. These bacteria survive in intestinal tracts, such as a dog, a *Meleagris gallopavo*, a goat, *Buta*, and a fowl, from the first, may pollute meat, and attract attention also as an item of food evaluation. After taking in food, the latent period to pathogenesis is averaged and symptoms will have the shape of gastroenteric inflammation, such as diarrhea, abdominal pain, fever, and vomiting, on two to the 5th. Moreover, a bacteremia may be started depending on the case and it is an important bacillus on clinical. The culture is not easy for an oxygen density to need 3 – 10% of absolute microaerophilic conditions using a culture medium with a special clearance low culture medium etc. generally to culture of the Campylobacter bacteria. Moreover, after these bacteria tend to become extinct and extract an ingredient, it is necessary to inspect them within 2 – 3 hours. Even if it generally extracts a stool specimen from patients, such as diarrhea, it is difficult to inspect immediately. Especially in the case of an outpatient, food poisoning, etc., the specimen which passed after specimen extraction on one to the 2nd will be inspected. Most genus *Campylobacter* will have become extinct in these cases, and an inspection result will be influenced greatly. Although the *Campylobacter pylori* (*C. pylori*) is separated from human stomach and duodenal mucous membrane and relation with an ulcer is discussed recently, there is no report that these bacteria are related to diarrhea. The *Campylobacter pylori* is classified according to the latest research as a HERIKOBAKUTA (*Helicobacter*) group without treating as *Campylobacter*. The pathogenic cause of the *Campylobacter* bacteria is not solved enough and factors, such as a toxin, are not known. In recent years, many the bacterial identifications and the detection of a toxin gene by gene diagnosis including a DNA probe are made. The gene which generally carries out the code of RIBOZOMARU RNA in the case of the *Campylobacter* bacteria is used as a probe. The gene sequence of this RIBOZOMARU RNA is already announced (for example, journal OBU bacteriology Journal of Bacteriology; 169-volume 2173 page 1987). Moreover, the nucleic-acid fragmentation for the *Campylobacter* bacteria detection is also well-known (a publication-number 2 No. -84200 official report, JP,2-154700,A, JP,3-112498,A). These arrays are *Campylobacter jejuni* (*Campylobacter jejuni*) and an object for detection of *Campylobacter coli* (*C. coli*), and are not appropriate for detection of the other *Campylobacter* bacteria.

**[0003]**

**[Problem(s) to be Solved by the Invention]** ROMANYUKU (Romaniuk, P.J.) whose this invention

persons are already well-known \*\* -- reference (journal OBU bacteriology Journal of Bacteriology; 169 Maki 2173 page 1987) As a result of compounding an oligonucleotide on a basis and considering various detection of the Campylobacter bacteria, it found out that the gene which carries out the code of RIBOZOMARU RNA of the Campylobacter bacteria seen at least in this country differed from ROMANYUKU's and others report in part. The purpose of this invention is direct and is offering the new oligonucleotide used for detection of simplicity, quickness, the specific and high sensitivity Campylobacter bacteria, and/or the pathogenic Campylobacter bacteria.

[0004]

[Means for Solving the Problem] As a result of repeating various examination about the RIBOZOMARU RNA gene of the Campylobacter bacteria, this invention persons get suitable oligo REOCHIDO for detection of the Campylobacter bacteria, establish the detection approach using it, and came to complete this invention. furthermore, this invention persons -- Campylobacter jejuni (Campylobacter jejuni) and Campylobacter coli (C.coli) etc. -- the oligonucleotide which reacts only to the Campylobacter bacteria considered that virulence is shown to Homo sapiens, and does not react to the other Campylobacter bacteria can also be obtained, the detection approach using it is established, and it came to complete this invention. Moreover, this invention persons are Campyrobacter FITASU (Campylobacter fetus). The oligonucleotide which reacts and does not react to the other Campylobacter bacteria can also be obtained, the detection approach using it is established, and it came to complete this invention.

[0005] That is, this invention is the oligonucleotide 1-14 (however, in an adenine and C, a cytosine and G express a guanine and, as for A, T expresses a thymine.) specific to the Campylobacter bacteria, i.e., an array-table and array numbers. Moreover, T of the location of arbitration is the indicator oligonucleotide which labeled the oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection and the above-mentioned oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection which have the nucleic-acid array shown for permuting by the uracil (U), or have a complementary array in them.

[0006] Moreover, this invention is the pathogenic Campylobacter bacteria especially Campylobacter jejuni (C. jejuni), and the oligonucleotide 1-12 (however, in an adenine and C, a cytosine and G express a guanine and, as for A, T expresses a thymine.), i.e., an array table and array numbers, specific to Campylobacter coli (C. coli). Moreover, T of the location of arbitration is the indicator oligonucleotide which labeled the oligonucleotide for the pathogenic Campylobacter bacteria detection and this oligonucleotide for the pathogenic Campylobacter bacteria detection which have the nucleic-acid array shown for permuting by the uracil (U), or have a complementary array in them. as such an oligonucleotide -- an array table and array number 7- the thing of 10 and 12 is desirable.

[0007] This invention is the specific oligonucleotide 1-14 (however, in an adenine and C, a cytosine and G express a guanine and T expresses [ A ] a thymine.) of these Campylobacter bacteria, i.e., an array table and array numbers. Moreover, [ whether T of the location of arbitration has the nucleic-acid array shown for permuting by the uracil (U), and ] Or the oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection which has a complementary array in them is labeled. The obtained indicator nucleic acid probe is made to cross with DNA or RNA in a sample. The method of detecting the Campylobacter bacteria in the sample characterized by measuring the indicator of the crossed combination, Or [ whether this oligonucleotide for the Campylobacter bacteria detection is made into a nucleic-acid primer as it is, and ] Or they are magnification of the Campylobacter bacteria in the sample characterized by measuring the primer expanding object which was made to cross the indicator primer labeled and obtained with DNA or RNA in a sample, was made to elongate a primer, and was obtained, and the detecting method.

[0008] Furthermore, this invention is the oligonucleotide 1-14 (however, in an adenine and C, a cytosine and G express a guanine and, as for A, T expresses a thymine.) specific to these Campylobacter bacteria, i.e., an array table and array numbers. Moreover, [ whether T of the location of arbitration has the nucleic-acid array shown for permuting by the uracil (U), and ] Or the indicator nucleic-acid oligonucleotide which labeled the oligonucleotide or this

oligonucleotide which contains \*\* with a complementary array in them is used as a probe. [ whether the reagent kit for the Campylobacter bacteria detection and the above-mentioned oligonucleotide which are included are made into a nucleic-acid primer as it is, and ] Or they are magnification of the Campylobacter bacteria which contain the indicator nucleic-acid oligonucleotide labeled and obtained as an indicator nucleic-acid primer, and a reagent kit for detection.

[0009] Since the oligonucleotide of this invention can be prepared by chemosynthesis, compared with the oligonucleotide or polynucleotide which cloned, it is possible ease and to obtain the oligonucleotide of fixed quality in large quantities and cheaply. A deoxyribonucleic acid (DNA) or a ribonucleic acid (RNA) is sufficient as the oligonucleotide of this invention. It cannot be overemphasized that thymidine residue (T) is read as uridine residue (U) in the case of a ribonucleic acid. Moreover, you may be DNA which compounds by changing T of the location of arbitration into U on the occasion of composition, and contains uridine residue. You may be RNA containing the thymidine residue which changed U of the location of arbitration into T similarly. Moreover, point mutation, such as deletion, insertion, or a permutation, and a qualification nucleotide may be in an oligonucleotide.

[0010] An indicator oligonucleotide is obtained by introducing the indicator of the radioactive substance, such as enzyme s(JP,3-64119,B etc.) 125I, insoluble support (Patent Publication Showa 63-502875 number official report), etc. into the above-mentioned oligonucleotide. Luminescent matter s (JP,62-39598,A etc.) Fluorescent material s (JP,63-122956,A etc.) Antigen (Patent Publication Showa 63-500007 number official report etc.) Hapten s (JP,62-2164,A, JP,62-167793,A, etc.) 32P, 3H The indicator joint approach follows the usual approach. For example, an enzyme can be labeled by permuting NUKURETOCHIDO which has a linker arm as a member of the oligonucleotide of the array of an array table and the array number 1-14. (Nucleic Acids Research, and 14, 6115 and 1986 reference) . As the example It is Patent Publication Showa 60-500717 about the uridine which has a linker arm in the 5th place. Chemosynthesis can be carried out from deoxyuridine with the synthesis method indicated by the number official report, and it can also introduce into the above-mentioned oligonucleotide. The indicator of the method of an indicator may be carried out in the middle of an array also with an end indicator. Moreover, an indicator may be association to sugar, a phosphoric-acid radical, and a base part.

[0011] Use (1) oligonucleotide as a probe, when detecting the Campylobacter bacteria using the oligonucleotide of this invention, make it cross with DNA or RNA in a sample, and it is made to cross with DNA or RNA in a sample by making the method of detecting a hybridization object, or (2) oligonucleotides into a primer, and DNA polymerase etc. performs an expanding reaction, and there is a method of detecting the purpose nucleic acid from the obtained expanding object. It becomes detectable [ the specified substance ] easily by introducing indicators, such as an antigen, hapten, an enzyme, a fluorescent material, photogene, an enzyme substrate, the radioactive substance, and insoluble support, into an oligonucleotide as mentioned above in these cases. When using an indicator oligonucleotide as a probe, the purpose nucleic acid can be detected by measuring an indicator by the suitable measuring method after hybridization with a sample. When using an oligonucleotide as a primer, the gene of only the Campylobacter bacteria can be specifically amplified by performing gene amplification (PCR; referring to JP,62-281,A) by DNA polymerase etc. The Campylobacter bacteria are easily detectable by the approach of making reaction time incorporating a radioactive indicator nucleotide on the occasion of PCR, and carrying out fractionation of the magnification product by electrophoresis, and detecting a unique band. Moreover, if the above-mentioned indicator oligonucleotide is used as a primer, it is also possible to carry out direct detection of the magnification product. s (JP,3-43099,A etc.) .

[0012] It can combine with solid phase support and the oligonucleotide of this invention can also be used as a prehension probe. In this case, it is \*\* [ it may perform sandwiches assay in the combination of a prehension probe and an indicator probe ]. s (JP,58-501703,A, JP,60-93355,A, JP,61-195699,A, etc.) There is also the approach of carrying out the indicator of the target-nucleus acid, and catching it. s (JP,63-313598,A etc.) . Moreover, there is also the approach of carrying out the indicator of the oligonucleotide by the biotin, and catching by avidin joint

support after hybridization. s (JP,61-274699,A etc.). If the oligonucleotide of this invention is used for either in sandwiches assay, specific measurement is attained by this oligonucleotide, and even if the singularity of the oligonucleotide of another side is low a little, it will be satisfactory in any way. As a hybridization buffer which carries out the hybridization reaction of the oligonucleotide or indicator oligonucleotide of this invention with DNA or RNA in a sample For example 5xSSC, 0.5% bovine serum albumin, 0.5% polyvinyl pyrrolidone, the buffer solution which contains sodium dodecyl sulfate 1% -- or -- 6xSSC and 0.5x DIN heart liquid -- 0.5% SDS and 100 mug/ml cow thymus gland DNA The included buffer solution, 50% (W/V) formamide, 5 xSSC, and 50 mM Na-PIPES The buffer solution (pH6.8) and 1x DIN heart liquid (O. [ Polyvinyl pyrrolidone ] O2% ficoll, 0.02% BSA, and 0.02%) There is the included buffer solution. Hybridization conditions follow the usual conditions.

[0013]

[Example] Below, an example explains this invention concretely.

Various composition of the oligonucleotide which has the array shown in an array table, the array numbers 1-14 (this invention), and 15-17 (example of a comparison) with a phospho aminodite method was carried out using the synthetic ABI company DNA synthesizer391 mold of example 1 various oligonucleotides. Hereafter, it is an oligonucleotide (1), respectively about the various oligonucleotides shown in an array table and the array numbers 1-17. It is called - (17). In addition, (15), (16), and (17) are the oligonucleotides compounded based on the array which ROMANYUKU and others reported in order to compare with this invention. technique follows an ABI company manual -- 0.2microM It carried out on the scale. 55-degree-C night operation of the deprotection of various oligonucleotides was carried out with aqueous ammonia. Purification was carried out in the opposition column-by Pharmacia manufacture FPLC. In addition, compound oligonucleotide (7) - (17) combined the 32P-phosphoric-acid radical with the five prime end by the following approaches as occasion demands.

Reaction mixture presentation Oligonucleotide 5 - 20pmoles 10xT-four polynucleotide kinase buffer solution 10 mul 1mM [gamma-32PATP (10 mCi/ml)] 1 mul T-four polynucleotide kinase (Toyobo make) 10 Unit Water the whole quantity -- 100 mul the becoming amount -- the reaction mixed liquor prepared as mentioned above -- 37 degrees C It was made to react for 1 hour. The 10xT-four polynucleotide kinase buffer solution is 0.5 M Tris-HCl (pH8.0) and 0.1M MgCl<sub>2</sub> and 0.1M here. 2-mercaptoethanol is shown.

[0014] Example 2 (1) It considered as Primers A, B, and C combining the oligonucleotide below the reagent kit for amplifying the Campylobacter bacteria origin nucleic acid. Primer A -- oligonucleotide (1) (2) Primer B -- oligonucleotide (3) (4) Primer C -- oligonucleotide (5) (6) from -- it becomes.

(a) the oligonucleotide (1) of an example 1, and (b) the oligonucleotide (2) of the example 1, and (c) Oligonucleotide of the example 1 ((3) d) Oligonucleotide of an example 1 ((4) e)

Oligonucleotide of an example 1 ((5) f) Oligonucleotide of an example 1 ((6) g) TthDNA polymerase (Toyobo make), dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (1) The feces sample was extracted from the patient by whom the enteric infection by the preparation Campylobacter bacteria of a specimen is suspected, and the nucleic acid was extracted. A nucleic-acid extract is PBS about culture or a feces sample. It \*\*\* and is after 15,000rpm and 10-minute alignment processing at long intervals and 200. mul The nucleic acid was extracted by adding and boiling water. In addition, it is Campylobacter jejuni NCTC 11351 as a standard stock of the Campylobacter bacteria. It cultivated and used as a specimen.

(3) PCR reaction mixture 90microl Oligonucleotide \*\* of said nucleic-acid extract 10microl and an example 1 5microl every -- in addition, the Campylobacter bacteria origin nucleic acid was amplified as a primer. a reaction mixture presentation -- 1mM Dithiothreitol, 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.01% (wt/vol) gelatin, respectively -- 0.2mM(s) dATP, dCTP, dGTP, dTTP, and Tth DNA Polymerase 40 unit / ml it is . The reaction condition is as follows.

Thermal denaturation: 94 degrees C and 0.5 A part, annealing: For 50 degrees C and the 2-minute primer B ((3), (4)), 65 degrees C and the 2-minute primer C ((5), (6)) are [ Primer A ((1), (2)) ] 54 degrees C and a 2-minute polymerization reaction. : 75 degrees C, the 2-minute above-

mentioned thermal denaturation, annealing, and a polymerization reaction were repeated 30 times. These actuation was performed using DNA thermal SAIKURA of Perkin-Elmer/SHITASU (Perkin-Elmer/Cetus).

[0015] (4) Detection 10microl Agarose gel electrophoresis of the reaction mixture was carried out 2%, and after carrying out ethidium-bromide dyeing, the fluorescence in ultraviolet rays was detected. The electric conditions of migration performed constant-voltage 100V and time amount for 30 minutes. The conditions of others [ list / operating-instructions ] are Maniatis's and others Molecular Cloning (1982). The approach of a publication was followed. The molecular weight marker also migrated to coincidence besides reaction mixture, and the die length of the nucleotide fragment detected by the comparison of whenever [ relative migration ] was computed.

(5) The PCR product of the specimen obtained from the result patient is at Primer A ((1), (2)). With 275 bases and Primer B ((3), (4)) With 240 bases and Primer C ((5), (6)) 279 bases were shown and it had the same nucleotide length as a Campyrobacter standard stock. about [ the die length of the nucleotide calculated from the nucleic-acid array whose ROMANYUKU (Rimaniuk, P.J. et al., Journal of Bacteriology; 169 volume, 2137 pages, 1987) reported this, and ] -- I did one.

[0016]

[Table 1]

P C R 増幅産物の塩基長

検体	プライマー		
	A (1)+(2)	B (3)+(4)	C (5)+(6)
患者 1	275	240	279
2	275	240	279
3	275	240	279
4	275	240	279
5	275	240	279
標準株	275	240	279

[0017] In order to check that the result of the check example 2 of the singularity of example of reference 1 reagent kit is specific to the Campylobacter bacteria, the actuation same about other bacteria as an example 2 was performed. The bacillus of the following table 2 was used for other bacteria. The result was negative as shown in the following table.

[0018]

[Table 2]

核酸の由来	結果
ヘリコバクター・ピロリ	—
シトロバクター・フレウディ	—
エンテロコッカス・フェカリス	—
エンテロコッカス・クロアカエ	—
大腸菌	—
クレブシェラ・オキシトカ	—
緑膿菌	—
セラチア・マルセッセンス	—
スタフィロコッカス・エピデルミス	—
ストレプトコッカス・アガラクチ	—
病原性大腸菌	—
毒素原性大腸菌	—
サルモネラ・エンテリティディス	—

[0019] Example 3 (1) Oligonucleotide of the reagent kit example 1 containing the probe for the Campyrobacter nucleic-acid detection (7) The reagent kit for detecting the Campyrobacter origin nucleic acid which contains in a five prime end the nucleic acid which has the 32P-phosphoric-acid radical by - (14) was created. presentation 1 a five prime end -- 32P- The indicator probe which has the phosphoric-acid radical, and the buffer solution for 2 hybridization (5xSSC, 0.5% BSA, 0.5% PVP, 1% SDS) from -- it becomes.

(2) The Campylobacter bacteria were detected using the detection above-mentioned reagent kit of the Campylobacter bacteria. It is the following table about a result. It is shown in 3. In addition, (15) compounded from the array which ROMANYUKU and others reported for the comparison, (16), and (17) were used, and it carried out to coincidence. A result is (7) of this invention, as shown in the following table 3. Although the Campylobacter bacteria were specifically detectable in - (14), respectively, in (15), (16), and (17), no Campylobacter bacteria were undetectable. (7) of this invention In - (10) and (12), Campylobacter jejuni and Campylobacter coli are alternatively detectable. In (13) of this invention, and (14), Campyrobacter FITASU is alternatively detectable.

[0020]

[Table 3]

プローブ	C. j.	C. c.	C. l.	C. f.	C. h.
(7)	+	+	+	-	+
(8)	+	+	+	-	+
(9)	+	+	+	-	+
(10)	+	+	-	-	+
(11)	+	+	+	+	+
(12)	+	+	+	-	+
(13)	-	-	-	+	-
(14)	-	-	-	+	-
(15)	-	-	-	-	-
(16)	-	-	-	-	-
(17)	-	-	-	-	-

C. j.: *Campylobacter jejuni*

C. c.: *C. coli*, C. l.: *C. laridis*,

C. f.: *C. fetus*, C. h.: *C. hyoilectinalis*

## [0021]

[Effect of the Invention] This invention enabled specifically detection of the *Campylobacter* bacteria, and/or identification of the *Campylobacter* bacteria kind to carry out by high sensitivity quickly and simple. The oligonucleotide of this invention can be used also as a probe for direct detection also as a primer of a magnification reaction. It is possible to detect the *Campylobacter* bacteria from a small amount of specimen for detection sensitivity especially high at a magnification reaction, and the clinical meaning is large.

## [0022]

[Layout Table] array number: -- die-length [ of one array ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the *Campylobacter* bacteria, and a complementary array.

Array CGCAACCCAC GTATTAGTT 20 [0023] array number: -- die-length [ of two arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the *Campylobacter* bacteria, and a complementary array.

Array GAACGTATTC ACCGTAGCAT 20 [0024] array number: -- die-length [ of three arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the *Campylobacter* bacteria, and a complementary array.

Array GGAGAGGCAG ATGGAATTGG 20 [0025] array number: -- die-length [ of four arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the *Campylobacter* bacteria, and a complementary array.

Array GCGACCGTAC TCCCCAGGCG 20 [0026] array number: -- die-length [ of five arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array AGGACAACAG TTGGAAACGA 20 [0027] array number: -- die-length [ of six arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array CCGAAAAGTG TCATCCTCCA 20 [0028] array number: -- die-length [ of seven arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array GTACGCTAGT TGTTGGGATG 20 [0029] array number: -- die-length [ of eight arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array AGTCATCTCA GTAATGCACG 20 [0030] array number: -- die-length [ of nine arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array TTGGGATGCT AGTCATCTCA 20 [0031] array number: -- die-length [ of ten arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array GTACACTAGT TGTTGGGGTG 20 [0032] array number: -- die-length [ of 11 arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array ACTGGAACGT AGACACCGGTC 20 [0033] array number: -- die-length [ of 12 arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array GTATGCTAGT TGTTGGGGTG 20 [0034] array number: -- die-length [ of 13 arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array CTATACTAGT TGTTGCTGTG 20 [0035] array number: -- die-length [ of 14 arrays ]: -- mold [ of 19 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..19 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array AGTCACGGCA GTAATGCAC 19 [0036] array number: -- die-length [ of 15 arrays ]: -- mold [ of 18 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..18 description --

it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array GTATACTAGT TGTTGCTC 18 [0037] array number: -- die-length [ of 16 arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array AGTCAGGGCA GTAATGCTCG 20 [0038] array number: -- die-length [ of 17 arrays ]: -- mold [ of 20 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- dimorphism voice topology: -- nucleic acid besides class: of a straight chain-like array description existence location [ of a synthetic DNA array ]: -- description: besides approach:S which determined 1..20 description -- it has the array of the Campylobacter bacteria, and a complementary array.

Array TTGGGATGCT AGTCATCTCA 20

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-276999

(43)公開日 平成5年(1993)10月26日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z NA A	8114-4B		
C 0 7 H 21/04		B		
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 6(全 8 頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願平4-80769	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成4年(1992)4月2日	(72)発明者	松岡 瑛 兵庫県芦屋市竹園町1-11

(72)発明者	香川 昌平 兵庫県西宮市東鳴尾町2-2-11-701
(72)発明者	大塚 則光 兵庫県西宮市里中町3-10-4
(72)発明者	山下 啓子 兵庫県西宮市上田町3-43-811

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチド、カンピロバクター属細菌の検出法及び検出用試薬キット

(57)【要約】

【目的】 直接的で簡便、迅速、特異的且つ高感度なカンピロバクター属細菌および/または病原性カンピロバクター属細菌の検出に用いるオリゴヌクレオチドを提供する。

【構成】 配列表の配列番号1～14に示す核酸配列を有するか、またはそれらの相補的配列を有するカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチド、害オリゴヌクレオチドを標識化した標識オリゴヌクレオチド、およびこれらのオリゴヌクレオチドを使用する試料中のカンピロバクター属細菌の検出法およびその検出用試薬キット。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表・配列番号1～14（但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル（U）と置換されてもよい。）に示す核酸配列を有するか、またはそれらの相補的配列を有するカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項2】 請求項1に記載のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化したカンピロバクター属細菌検出用標識オリゴヌクレオチド。

【請求項3】 請求項1に記載のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化し、得られた標識核酸プローブを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、交雑した結合体の標識を測定することを特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の検出法。

【請求項4】 請求項1のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとするかまたは標識化して得られた標識核酸プライマーを、試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、プライマー伸長させ、得られたプライマー伸長物を測定することを特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の検出法。

【請求項5】 請求項1のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識して得られた標識核酸プローブを含むことを特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の検出用試葉キット。

【請求項6】 請求項1のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとして含むかまたは標識化して得られた標識核酸プライマーを含むことを特徴とするカンピロバクター属細菌の増幅、検出用試葉キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はカンピロバクター（*Campylobacter*）属細菌を簡便かつ迅速に検出することに関する。更に詳しくは、カンピロバクター属に属する細菌の中で腸管感染症の起炎菌となる細菌を検出することに関する。

## 【0002】

【従来の技術】カンピロバクター属細菌は、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ウシなどの家畜の病原菌であって、流産、下痢症などを起こすことで知られている。ヒトの下痢症の起炎菌としては主にカンピロバクター・ジェジュニ（*C. jejuni*）、カンピロバクター・コリ（*C. coli*）などが知られている。これらの細菌は食中毒原因菌として認められている。これらの細菌はもともとイヌ、七面鳥、ヤギ、ブタ、ニワトリなどの腸管に生存しており、食肉を汚染する場合もあり、食品検査の項目としても注目を集めている。食品を摂取してから発病までの潜伏期間は平均して、2～5日、症状は下痢、腹痛、発熱、嘔吐などの胃腸炎症状である。また場合によっては菌血症を起こ

すことがあり、臨床上重要な菌である。カンピロバクター属細菌の培養には一般にスクリー培地などの特殊な培地を用い、酸素濃度が3～10%の絶対微好気性条件を必要とするなど、その培養は容易ではない。またこの細菌は死滅しやすく、材料を採取した後、2～3時間以内に検査する必要がある。一般に下痢などの患者から便検体を採取しても直ちに検査することは困難である。特に外来患者、食中毒などの場合は検体採取後1～2日経過した検体を検査することになる。これらの場合カンピロバクター属細菌はほとんど死滅しており、検査結果に大きく影響することになる。最近、カンピロバクター・ピロリ（*C. pylori*）がヒトの胃・十二指腸粘膜から分離され、潰瘍との関係が論じられているが、この細菌が下痢症と関連があるとの報告はない。最近の研究ではカンピロバクター・ピロリはカンピロバクター属としては扱わないのでヘリコバクター（*Helicobacter*）属として分類されている。カンピロバクター属細菌の病原性の原因は充分解明されておらず、毒素などの因子は判っていない。近年、DNAプローブをはじめとする遺伝子診断による細菌の同定や毒素遺伝子の検出が多くなされている。カンピロバクター属細菌の場合一般にリボゾーマルRNAをコードする遺伝子がプローブとして使用されている。このリボゾーマルRNAの遺伝子配列は既に発表されている（例えばジャーナル・オブ・バクテリオロジー *Journal of Bacteriology*; 169巻2173頁1987年）。またカンピロバクター属細菌検出用の核酸フラグメントも公知である（特開平2-84200号公報、特開平2-154700号公報、特開平3-112498号公報）。これらの配列はカンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、カンピロバクター・コリ（*C. coli*）の検出用であり、その他のカンピロバクター属細菌の検出には適当でない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは既に公知となっているロマニュク（Romaniuk, P.J.）らの文献（ジャーナル・オブ・バクテリオロジー *Journal of Bacteriology*; 169巻2173頁1987年）をもとにオリゴヌクレオチドを合成し、カンピロバクター属細菌の検出を種々検討した結果、少なくとも本邦で見られるカンピロバクター属細菌のリボゾーマルRNAをコードする遺伝子はロマニュクらの報告と一部異なっていることを見出した。本発明の目的は、直接的で簡便、迅速、特異的且つ高感度なカンピロバクター属細菌及び／または病原性カンピロバクター属細菌の検出に用いる新規なオリゴヌクレオチドを提供することである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らはカンピロバクター属細菌のリボゾーマルRNA遺伝子に関して種々の検討を重ねた結果、カンピロバクター属細菌の検出に適当なオリゴヌクレオチドを得、それを用いた検出方法を確立し、本発明を完成させるに至った。更に本発明者らは

カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 、カンピロバクター・コリ (*C. coli*) などのヒトに対して病原性を示すと考えられているカンピロバクター属細菌のみに反応し、他のカンピロバクター属細菌には反応しないオリゴヌクレオチドも得ることができ、それを用いた検出方法を確立し、本発明を完成させるに至った。また本発明者らはカンピロバクター・フィータス (*Campylobacter fetus*) のみに反応し、他のカンピロバクター属細菌には反応しないオリゴヌクレオチドも得ることができ、それを用いた検出方法を確立し、本発明を完成させるに至った。

【0005】すなわち本発明はカンピロバクター属細菌に特異的なオリゴヌクレオチド、すなわち、配列表・配列番号1～14（但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル（U）と置換されてもよい）に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有するカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドおよび上記カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化した標識オリゴヌクレオチドである。

【0006】また本発明は病原性カンピロバクター属細菌、特にカンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*) 、カンピロバクター・コリ (*C. coli*) に特異的なオリゴヌクレオチド、すなわち、配列表・配列番号1～12（但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル（U）と置換されてもよい）に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有する病原性カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドおよび該病原性カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化した標識オリゴヌクレオチドである。このようなオリゴヌクレオチドとしては、配列表・配列番号7～10、12のものが好ましい。

【0007】本発明は該カンピロバクター属細菌の特異的なオリゴヌクレオチド、すなわち配列表・配列番号1～14（但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル（U）と置換されてもよい）に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有するカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化し、得られた標識核酸プローブを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、交雑した結合体の標識を測定することを特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の検出法、または該カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとするか、または標識化して得られた標識プライマーを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、プライマーを伸長させ、得られたプライマー伸長物を測定することを特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の増幅、検出法である。

【0008】さらに本発明は該カンピロバクター属細菌

に特異的なオリゴヌクレオチド、すなわち、配列表・配列番号1～14（但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル（U）と置換されてもよい）に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有するを含有するオリゴヌクレオチドあるいは該オリゴヌクレオチドを標識化した標識核酸オリゴヌクレオチドをプローブとして含むカンピロバクター属細菌検出用試薬キットおよび上記オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとするか、または標識化して得られた標識核酸オリゴヌクレオチドを標識核酸プライマーとして含有するカンピロバクター属細菌の増幅、検出用試薬キットである。

【0009】本発明のオリゴヌクレオチドは化学合成により調製できるので、クローン化したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに比べ、容易、大量且つ安価に一定品質のオリゴヌクレオチドを得ることが可能である。本発明のオリゴヌクレオチドはデオキシリボ核酸（DNA）でもリボ核酸（RNA）でもよい。リボ核酸の場合はチミジン残基（T）をウリジン残基（U）と読み替えることは言うまでもない。また合成に際して任意の位置のTをUに変えて合成を行ない、ウリジン残基を含むDNAであってもよい。同様に任意の位置のUをTに変えたチミジン残基を含むRNAであってもよい。またオリゴヌクレオチド中に欠失、挿入あるいは置換といった点突然変異や、修飾ヌクレオチドがあってもよい。

【0010】上記オリゴヌクレオチドに酵素（特公平3-64119号公報など）、発光性物質（特開昭62-39598号公報など）、蛍光物質（特開昭63-122956号公報など）、抗原（特表昭63-500007号公報など）、ハプテン（特開昭62-2164号公報、特開昭62-167793号公報など）、<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>Iなどの放射性物質、不溶性担体（特表昭63-502875号公報）などの標識を導入することにより標識オリゴヌクレオチドを得る。標識結合方法は通常の方法に従う。例えばリンカーアームを有するヌクレオチドを配列表・配列番号1～14の配列のオリゴヌクレオチドの一員として置換することにより酵素を標識化することができる（Nucleic Acids Research, 14, 6115, 1986参照）。その一例として5位にリンカーアームを有するウリジンを特表昭60-500717号公報に開示された合成法によりデオキシリジンから化学合成し、上記オリゴヌクレオチドに導入することもできる。標識の仕方は末端標識でも、配列の途中に標識してもよい。また標識は糖、リン酸基、塩基部分への結合であってもよい。

【0011】本発明のオリゴヌクレオチドを用いてカンピロバクター属細菌を検出する場合、（1）オリゴヌクレオチドをプローブとして試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、交雫物を検出する方法、または（2）オリゴヌクレオチドをプライマーとして試料中のDNAまたはRNAと交雫させ、DNAポリメラーゼ等により伸長反応を行い、得られた伸長物から目的核酸を検出する

方法がある。これらの場合、上述のようにオリゴヌクレオチドに抗原、ハプテン、酵素、蛍光物質、発光物質、酵素基質、放射性物質、不溶性担体などの標識を導入することにより容易に目的物の検出が可能となる。標識オリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合、試料とのハイブリダイゼーション後に、標識を適当な測定法で測定することにより目的核酸を検出することができる。オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、DNAポリメラーゼ等による遺伝子増幅（PCR；特開昭62-281号公報参照）を行なうことによりカンピロバクター属細菌のみの遺伝子を特異的に増幅することができる。PCRに際しては反応時に放射性標識ヌクレオチドを取り込ませる方法や、増幅産物を電気泳動により分離して特異なバンドを検出することで容易にカンピロバクター属細菌を検出することができる。また前述の標識オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いれば増幅産物を直接検出することも可能である（特開平3-43099号公報など）。

【0012】本発明のオリゴヌクレオチドは固相担体に結合して、捕捉プローブとして用いることもできる。この場合、捕捉プローブと標識プローブの組合せてサンドイッチアッセイを行ってもよいし（特開昭58-501703号公報、特開昭60-93355号公報、特開昭61-195699号公報など）、標的核酸を標識して捕捉する方法もある（特開昭63-313598号公報など）。またオリゴヌクレオチドをビオチンで標識し、ハイブリダイゼーション後、アビシン結合担体で捕捉する方法もある（特開昭61-274699号公報など）。サンドイッチアッセイにおいてはどちらか一方に本発明のオリゴヌクレオチドを用いれば、該オリゴヌクレオチドにより特異的な測定が可能となり、他方のオリゴヌクレオチドの特異性は若干低くともなんら問\*

#### 反応液組成

オリゴヌクレオチド	5 ~20pmoles
10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液	10 μl
1 mM [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP (10mCi/ml)]	1 μl
T4ポリヌクレオチドキナーゼ（東洋紡製）	10 単位

#### 水

上記のように調製した反応混合液を37°Cで1時間反応させた。ここで10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液とは、0.5M Tris-HCl(pH8.0)、0.1M MgCl<sub>2</sub>、0.1M 2-メルカプトエタノールを示す。

#### 【0014】実施例2

(1) カンピロバクター属細菌由来核酸を増幅するための試薬キット

以下のオリゴヌクレオチドを組み合わせて、プライマーA、B、Cとした。プライマーAは、オリゴヌクレオチド(1)と(2)、プライマーBはオリゴヌクレオチド(3)と(4)、プライマーCはオリゴヌクレオチド(5)と(6)からなる。

(a) 実施例1のオリゴヌクレオチド(1)

\* 題はない。本発明のオリゴヌクレオチドまたは標識オリゴヌクレオチドを試料中のDNAまたはRNAと交雑反応させるハイブリダーゼーションバッファーとしては、例えば5×SSC、0.5%ウシ血清アルブミン、0.5%ポリビニルピロリドン、1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む緩衝液または6×SSC、0.5×デンhardt液、0.5%SDS、100 μg/ml牛胸腺DNAを含む緩衝液、50%(W/V)ホルムアミド、5×SSC、50mM Na-PIPES緩衝液(pH6.8)、1×デンhardt液(0.02%フィコール、0.02%BSA、0.02%ポリビニルピロリドン)を含む緩衝液などがある。交雑条件は、通常の条件に従う。

#### 【0013】

【実施例】以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

#### 実施例1

##### 各種オリゴヌクレオチドの合成

A B I社DNAシンセサイザー391型を用いて、ホスホアミダイト法にて配列表・配列番号1～14（本発明）および15～17（比較例）に示される配列を有するオリゴヌクレオチドを各種合成した。以下、配列表・配列番号1～17に示される各種オリゴヌクレオチドを、それぞれオリゴヌクレオチド(1)～(17)と呼ぶ。なお、(15)、(16)、(17)は本発明と比較するためロマニュークラの報告した配列をもとに合成したオリゴヌクレオチドである。手法はA B I社マニュアルに従い、0.2 μMスケールで実施した。各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55°C一夜実施した。精製はファルマシア社製FPLCで逆相カラムにて実施した。なお合成したオリゴヌクレオチド(7)～(17)は必要により以下の方法で5'末端に<sup>32</sup>P-リン酸基を結合させた。

30 方法で5'末端に<sup>32</sup>P-リン酸基を結合させた。

#### 反応液組成

オリゴヌクレオチド	5 ~20pmoles
10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液	10 μl
1 mM [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP (10mCi/ml)]	1 μl
T4ポリヌクレオチドキナーゼ（東洋紡製）	10 単位

#### 水

#### 全量が100 μl となる量

- (b) 実施例1のオリゴヌクレオチド(2)
- (c) 実施例1のオリゴヌクレオチド(3)
- 40 (d) 実施例1のオリゴヌクレオチド(4)
- (e) 実施例1のオリゴヌクレオチド(5)
- (f) 実施例1のオリゴヌクレオチド(6)
- (g) T th DNAポリメラーゼ（東洋紡製），dATP, dCTP, dGTP, dTTP

#### (1) 検体の調製

カンピロバクター属細菌による腸管感染症が疑われる患者から糞便試料を採取し、核酸を抽出した。核酸抽出は培養菌または糞便試料をPBSに懸濁し、15,000rpm、10分間遠心処理後、200 μlの水を加え、煮沸することにより核酸を抽出した。なお、カンピロバクター属細菌の

標準株として *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 を培養し検体として用いた。

### (3) PCR

反応液 90 μl に前記核酸抽出液 10 μl、実施例 1 のオリゴヌクレオチド各 5 μl ずつをプライマーとして加え、カンピロバクター属細菌由来核酸の増幅を行った。反応液組成は 1 mM ジチオスレイトール、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.01% (wt/vol) ゼラチン、それぞれ 0.2 mM の dATP、dCTP、dGTP、dTTP および Tth DNA ポリメラーゼ 40 単位/ml である。反応条件は次の通りである。

熱変性： 94°C、0.5 分、

アニーリング：プライマー A ((1)(2)) は、50°C、2 分

プライマー B ((3)(4)) は、65°C、2 分

プライマー C ((5)(6)) は、54°C、2 分

重合反応： 75°C、2 分

上記熱変性、アニーリング、重合反応を 30 回繰り返した。これらの操作はパーキンエルマー／シータス (Perkin-Elmer/Cetus) 社の DNA サーマルサイクラーを用いて行った。

### 【0015】(4) 検出

10 μl の反応液を 2% アガロースゲル電気泳動し、エチジウムプロマイド染色した後、紫外線での蛍光を検出した。泳動の電気的条件は、定電圧 100V、時間は 30 分行った。操作方法並びに他の条件は Maniatis らの Molecular Cloning (1982) に記載の方法に従った。反応液の他に分子量マーカーも同時に泳動し、相対泳動度の比較により、検出されたヌクレオチド断片の長さを算出した。

### (5) 結果

患者より得られた検体の PCR 産物はプライマー A ((1)(2)) では 275 塩基、プライマー B ((3)(4)) では 240 塩基、プライマー C ((5)(6)) では 279 塩基を示し、カンピロバクター標準株と同じヌクレオチド長を有していた。これはロマニューク (Rimaniuk, P.J. ら、Journal of Bacteriology; 169巻、2137頁、1987年) の報告した核酸配列から計算されるヌクレオチドの長さとほぼ一致した。

### 【0016】

#### 【表 1】

#### PCR 増幅産物の塩基長

検体	プライマー		
	A (1)+(2)	B (3)+(4)	C (5)+(6)
患者 1	275	240	279
2	275	240	279
3	275	240	279
4	275	240	279
5	275	240	279
標準株	275	240	279

### 【0017】参考例 1

#### 試葉キットの特異性の確認

20 実施例 2 の結果がカンピロバクター属細菌に特異的であることを確認するために他の細菌についても実施例 2 と同様の操作を行なった。他の細菌には下記表 2 の菌を用いた。結果は下表のごとく陰性であった。

### 【0018】

#### 【表 2】

核酸の由来	結果
ヘリコバクター・ピロリ	-
シトロバクター・フレウディ	-
エンテロコッカス・フェカリス	-
エンテロコッカス・クロアカエ	-
大腸菌	-
クレブシェラ・オキシトカ	-
緑膿菌	-
セラチア・マルセッセンス	-
スタフィロコッカス・エビデルミス	-
ストレプトコッカス・アガラクチ	-
病原性大腸菌	-
毒素原性大腸菌	-
サルモネラ・エンテリティディス	-

### 【0019】実施例 3

(1) カンピロバクター核酸検出用プローブを含む試葉キット

50 実施例 1 のオリゴヌクレオチド (7) ~ (14) で、5'末端

に、<sup>32</sup>P-リン酸基を有している核酸を含むカンピロバクター由来核酸を検出するための試薬キットを作成した。組成は 1) 5'末端に<sup>32</sup>P-リン酸基を有している標識プローブ、2)ハイブリダイゼーション用緩衝液 (5×SSC、0.5% BSA、0.5% PVP、1% SDS)からなる。

#### (2) カンピロバクター属細菌の検出

上記試薬キットを用いてカンピロバクター属細菌の検出を行なった。結果を下記表 3に示す。なお比較のためにロマニュークラの報告した配列から合成した(15)、(16)、(17)も用いて同時に実施した。結果は下記表3に示すとく本発明の(7)～(14)ではそれぞれカンピロバクター属細菌を特異的に検出できたが、(15)、(16)、(17)ではどのカンピロバクター属細菌も検出できなかった。本発明の(7)～(10)および(12)ではカンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コリを選択的に検出できる。本発明の(13)、(14)ではカンピロバクター・フィータスを選択的に検出できる。

【0020】

【表3】

プローブ	C. j.	C. c.	C. l.	C. f.	C. h.
(7)	+	+	+	-	+
(8)	+	+	+	-	+
(9)	+	+	+	-	+
(10)	+	+	-	-	+
(11)	+	+	+	+	+
(12)	+	+	+	-	+
(13)	-	-	-	+	-
(14)	-	-	-	+	-
(15)	-	-	-	-	-
(16)	-	-	-	-	-
(17)	-	-	-	-	-

C. j.: *Campylobacter jejuni*

C. c.: *C. coli*, C. l.: *C. laridis*,

C. f.: *C. fetus*, C. h.: *C. hyoilectinalis*

【0021】

【発明の効果】本発明によりカンピロバクター属細菌の検出及び／またはカンピロバクター属細菌種の同定を迅速、簡便に特異的且つ高感度で実施することが可能となった。本発明のオリゴヌクレオチドは増幅反応のプライマーとしても、直接検出用のプローブとしても用いることが可能である。特に増幅反応では高い検出感度のため少量の検体からのカンピロバクター属細菌を検出するこ

とが可能で、その臨床的意義は大きい。

【0022】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

10 存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

CCCAACCCAC GTATTTAGTT

20

【0023】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

GAACGTATTTC ACCGTAGCAT

20

【0024】配列番号：3

30 配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

40 配列

CGAGAGCCAG ATGGAATTGG

20

【0025】配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

50 特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

CCGACCGTAC TCCCCAGGGC

20

【0026】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

AGGACAACAG TTGAAACGA

20

【0027】配列番号：6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

CCGAAAGTG TCATCCTCCA

20

【0028】配列番号：7

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

GTACGCTAGT TGTTGGATG

20

【0029】配列番号：8

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

AGTCATCTCA GTAATGCACG

20

【0030】配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

TTGGGATGCT AGTCATCTCA

20

【0031】配列番号：10

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

GTACACTAGT TGTTGGGTG

20

【0032】配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

ACTGGAACGT AGACACGGTC

20

【0033】配列番号：12

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

13

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

GTATGCTAGT TGTTGGGTG

20

【0034】配列番号：13

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

CTATACTAGT TGTTCTGTG

20

【0035】配列番号：14

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..19

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

AGTCACGGCA GTAATGCAC

19

【0036】配列番号：15

配列の長さ：18

配列の型：核酸

\*

14

＊鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..18

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

GTATACTAGT TGTTGCTC

18

【0037】配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

AGTCACGGCA GTAATGCTCG

20

【0038】配列番号：17

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

TTGGGATGCT AGTCATCTCA

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 12 Q 1/04

C 12 R 1:01)

(72)発明者 熊谷 昇子

北海道札幌市東区北16条6-2-9 ラ・

ポール美香保A 705

(72)発明者 佐藤 美雪

兵庫県神戸市垂水区神陵台4-1-55-

307